

Orsay

Série A

N° d'ordre : 348

Sujet de la thèse :

Relations entre le virus Sigma et son hôte, la Drosophile,
en présence du gène réfractaire.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de
Doctorat ès Sciences Naturelles
enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.O. 2 312

GAY Pierre

soutenue le 26 Avril 1968 à la FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY
devant le jury :

MM.	A. LWOFF	Président
	Ph. L'HERITIER	Examineur
	G. BRUN	"

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Janvier 1968, Tome 114.)

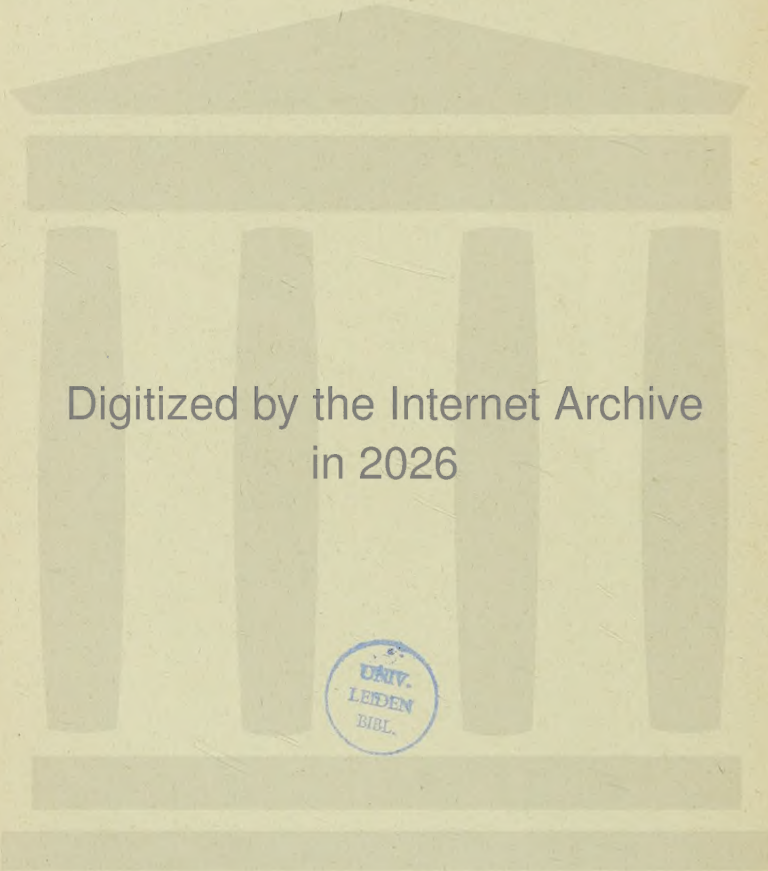
TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DU VIRUS SIGMA
PAR DES DROSOPHILES
PORTEUSES DU GÈNE " RÉFRACTAIRE ".

I. — ÉTUDE D'UNE SOUCHE VIRALE $P^{-}g^{-}$

PAR

Pierre GAY et Claudette OZOLINS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026



TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DU VIRUS SIGMA PAR DES DROSOPHILES PORTEUSES DU GÈNE " RÉFRACTAIRE " (*).

I. - ÉTUDE D'UNE SOUCHE VIRALE P⁻g-

par Pierre GAY et Claudette OZOLINS

(Laboratoire de Génétique des Virus du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette
[Directeur : Ph. L'HÉRITIER])

INTRODUCTION

Depuis la découverte du phénomène de la sensibilité au CO₂ (L'Héritier et Teissier [7] et de l'agent responsable : le virus σ , de nombreuses études ont été consacrées à ce sujet. La situation peut se résumer comme suit.

La sensibilité au CO₂ se détecte en plongeant des drosophiles pendant un quart d'heure dans une atmosphère de CO₂. Cette opération ne provoque chez les drosophiles appelées « résistantes » qu'une narcose temporaire alors que les « sensibles » demeurent définitivement paralysées.

L'acquisition de la sensibilité au CO₂ peut se faire selon deux modalités :

- par transmission héréditaire ;
- par inoculation artificielle d'un extrait infectieux.

A. — ÉTUDE DE LA TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DE σ

Celle-ci conduit à reconnaître l'existence de deux types de relations virus-hôtes : l'état stabilisé et l'état non stabilisé.

1° *L'état stabilisé* est caractérisé essentiellement par le fait que les femelles de ce type transmettent généralement σ à la totalité de leurs descendants, ceux-ci étant à leur tour de type stabilisé. Dans l'état stabilisé, des génomes viraux sont présents dans les cellules germinales de tous les stades.

Cependant il arrive quelquefois que l'on observe parmi la descendance d'une femelle stabilisée, l'apparition d'individus résistants

(*) Manuscrit reçu le 22 juin 1967.

donc dépourvus de virus. Cet accident appelé « décrochage » consiste en la perte des génômes viraux par les cellules de la lignée germinale.

Ces décrochages peuvent être spontanés (Iconomidis et L'Héritier [4] ou provoqués par des agents divers (Brun [3], Ohanessian [8]).

Chez le mâle, l'état stabilisé s'accompagne de la présence de génômes viraux dans une fraction, au moins, des spermatozoïdes. Il n'est cependant jamais transmis lui-même par hérédité paternelle.

2° *Le cas d'une femelle non stabilisée* est différent. C'est une femelle dont seul le soma est infecté primairement et dont le germe ne sera éventuellement infecté que secondairement. Cette infection du germe, appelé couramment « passage au germe » (ou P.G.) a lieu au niveau des cystes ovariens. Elle requiert la présence du gène g^+ dans le génôme du virus et suit une cinétique depuis longtemps décrite (Plus [9], Brun [3]). Ce passage au germe n'a absolument jamais lieu quand on a affaire à un virus portant le caractère g^- .

Ces deux catégories de mouches diffèrent aussi par une récolte virale plus abondante chez les non stabilisées que chez les stabilisées.

B. — ETUDE DE L'ACQUISITION ARTIFICIELLE DE σ

Cette étude a conduit Ohanessian [8] à distinguer deux types de drosophiles auxquels correspondent deux types de virus.

1° Les mouches-hôtes utilisées généralement sont du type sauvage symbolisé par $+/+$. Tous les virus infectieux sont capables de s'y multiplier, de donner une récolte virale et de conférer à ces hôtes la sensibilité au CO_2 .

2° Les mouches de la souche « Paris » portent sur le deuxième chromosome le gène réfractaire *re*, elles sont symbolisées par *re/re*. Dans de tels hôtes, seules peuvent se multiplier certaines souches de σ , dites P^+ , les autres souches dites P^- en sont incapables.

On peut, bien entendu, obtenir des mouches hétérozygotes pour le gène réfractaire, c'est-à-dire des mouches *re/+*. Les virus P^- arrivent à s'y multiplier mais avec une faible efficacité. Ce problème sera d'ailleurs l'objet d'une publication prochaine.

C. — TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DE σ PAR DES MOUCHES RÉFRACTAIRES

L'introduction du gène *re* par croisement dans une lignée stabilisée a été réalisée par Brun pour les mouches ρ et ultra- ρ , et par Ohanessian qui a utilisé des mouches stabilisées pour un virus g^-P^- . Il ressort de ces travaux que la présence du gène *re* à l'état hétérozygote augmente la fréquence des décrochages. Ohanessian a mon-

tré de plus que les descendants homozygotes *re/re*, issus de femelles hétérozygotes de lignée stabilisée sont généralement résistantes au CO_2 . Cependant les femelles de ce type sont capables de transmettre le virus à leurs descendants hétérozygotes. L'étude de ce phénomène a été reprise en pratiquant systématiquement des croisements individuels qui permettent l'analyse de la descendance d'une seule femelle.

Dans chaque lignée généalogique les points suivants ont été étudiés :

- 1° Transmission héréditaire de σ et développement de la sensibilité au CO_2 .
- 2° Richesse de l'hôte en virus infectieux aux différents stades de son développement et variation de cette richesse selon son génotype.
- 3° Possibilité de surinfection aux différents stades.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — MATÉRIEL EMPLOYÉ

1° Trois catégories de souches de drosophile de l'espèce *Drosophila melanogaster* ont été utilisées :

Souche sauvage symbolisée par $+/+$.

Souche réfractaire symbolisée par *re/re*.

Hôtes réfractaires hétérozygotes *re/+*.

Il est utile de distinguer phénotypiquement les drosophiles « réfractaires » homozygotes et hétérozygotes. Pour cela il est pratique d'introduire dans le génôme de la drosophile, le complexe chromosomique *Curly* (symbole *Cy*) qui est un marqueur génétique classique et se trouve situé comme le gène *re* sur le deuxième chromosome. Ainsi le fait qu'une imago soit *Curly* ou non indique un génotype « réfractaire » hétérozygote ou homozygote.

2° Les souches virales utilisées et leurs caractères :

Souche virale *A6* = $g^-P^+v^+$.

Souche virale *Bel* = $g^+P^+v^+$.

Souche virale ultra- ρ : c'est une souche défective ne produisant pas de virus infectieux et les mouches qui l'hébergent ne sont pas sensibles au CO_2 .

g^+ : le caractère g^+ permet à un virus d'infecter les ovocytes d'une femelle non stabilisée (passage au germen). Des femelles inoculées avec un virus g^+ engendrent donc une descendance en partie sensible.

g^- : le caractère g^- , au contraire, empêche tout passage au germen.

v^+ : un mâle stabilisé avec un virus v^+ transmet σ à une partie de sa descendance. On appelle valence la fréquence des individus infectés dans la descendance du croisement d'un tel mâle avec une femelle sans virus (s. v.).

v^- : un mâle stabilisé avec un virus v^- présente une valence nulle.

P^- : à la suite d'une inoculation, la multiplication d'un virus de caractère P^- est nulle dans des hôtes re/re , ralentie dans des hôtes $re/+$ et normale dans des hôtes $+/+$.

P^+ : la multiplication d'un virus P^+ n'est pas sensiblement modifiée par la présence du gène réfractaire.

II. — TECHNIQUES

Toutes les techniques employées : préparation des extraits virulents, inoculation, test de la sensibilité au CO_2 sont couramment pratiquées au laboratoire et ont été décrites par plusieurs auteurs.

Une technique moins courante est celle de la préparation d'un broyat de cyste ovarien. Cette technique, mise au point et décrite par Bregliano [2], consiste pour l'essentiel en ceci : les ovaires d'une femelle stabilisée sont extraits, les ovarioles dilacérés et les cystes isolés. On choisit les cystes au stade 10 B de la nomenclature de King et coll. [5]. Les raisons de ce choix sont les suivantes : d'une part, ce stade est aisément reconnaissable du fait que l'ovocyte occupe la moitié du cyste et les cellules nourricières l'autre moitié. D'autre part, Bregliano [2] a montré que c'est à ce stade que les cystes sont le plus riche, notre étude en était donc plus facile.

Pour connaître la richesse en virions d'un individu, on procède à l'extraction de sa récolte virale par broyat. Ensuite, cet extrait sera inoculé à ses hôtes de référence. Deux situations peuvent alors se présenter selon que l'extrait est pauvre ou riche en virions. Dans le premier cas, une partie seulement des mouches inoculées sera infectée. La loi de Poisson nous permet alors de calculer directement la richesse de l'extrait. Dans le deuxième cas, toutes les mouches inoculées deviennent sensibles et nous obtenons un temps d'incubation qui est le temps moyen au bout duquel un lot de mouches devient sensible après inoculation. On sait que ce temps d'incubation dépend de la concentration de l'inoculum et peut donc être utilisé pour le dosage biologique du virus. Toutefois la relation est spécifique de chaque souche virale.

III. — PLAN DES EXPÉRIENCES

Pour étudier l'évolution de l'accumulation de virions au cours de la vie de la drosophile, quatre stades ont été choisis. Ce sont :

- le cyste au stade 10 B ;
- la larve jeune d'un jour ;
- la larve vieille prise vingt-quatre heures avant la pupaison ;
- l'imago âgée d'une semaine.

Le tableau I montre :

- 1° Les différents croisements effectués.
- 2° Le génotype des cystes au stade 10 ; ceux-ci étant bloqués en métaphase I, sont diploïdes et ont le génotype de la mère.
- 3° Le génotype des différents descendants obtenus.

TABLEAU I. — Différents types de croisements réalisés.

TYPES DE CROISEMENTS	GÉNOTYPE DES CYSTES	GÉNOTYPE DES DESCENDANTS
I. ♀ +/+ stab. × ♂ <i>re/re</i> s. v.	+ / +	<i>re</i> / +
↓		
II. ♀ <i>re</i> / + stab. × ♂ <i>re/re</i> s. v.	<i>re</i> / +	<i>re</i> / + et <i>re/re</i>
↑		
↓		
III. ♀ <i>re/re</i> stab. × ♂ + / + s. v.	<i>re/re</i>	<i>re</i> / +
↓		
IV. ♀ <i>re</i> / + non stab. × ♂ + / + s. v. ...	<i>re</i> / +	<i>re</i> / + et + / +
stab. = mouche stabilisée ; non stab. = mouche non stabilisée ; s. v. = mouche sans virus.		

RÉSULTATS

Dans les expériences décrites ici, nous avons travaillé avec un virus g^- donc sans qu'il y ait possibilité de réinfection secondaire du germe en cas de décrochage. C'est le cas qui nous a paru le plus favorable pour différencier aisément les femelles stabilisées (descendance sensible au CO_2), des femelles non stabilisées (descendance entièrement résistante au CO_2) et pour évaluer l'importance des décrochages quand ils se produisent.

A. — TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DE σ ET SENSIBILITÉ AU CO_2

Les croisements indiqués ci-dessous se réfèrent au tableau I.

CROISEMENT I.

C'est à ce niveau que l'introduction du gène *re* dans une souche stabilisée banale est réalisée. La femelle est stabilisée et engendre une descendance le plus souvent entièrement sensible au CO_2 . L'introduction du gène *re* au moment de la fécondation n'exerce donc pas d'influence sur l'expression par l'individu de la présence du virus apporté à l'état stabilisé par le gamète maternel.

CROISEMENT II.

A l'issue de ce croisement on obtient une descendance formée de deux classes génétiques.

a) Classe *re/+*. — Les mouches de ce génotype sont sensibles au CO_2 . Lorsqu'il s'agit de femelles, elles sont capables, à leur tour, d'engendrer dans les mêmes conditions des mouches *re/+* sensibles.

Donc les femelles *re/+* mères du croisement II sont stabilisées ainsi que leurs filles de même génotype. Il est donc possible, à travers des générations de femelles *re/+*, de perpétuer indéfiniment le virus (ceci a été actuellement réalisé depuis près de 50 générations).

Avec la souche virale utilisée, l'infection secondaire du germe étant impossible, toute perte du virus par la lignée germinale est définitive. Il faut noter que chez les femelles *re/+* la fréquence de décrochage est élevée et peut varier de 0,05 à 0,9. Ces femelles sont donc habituellement des mosaïques germinales. Dans ces conditions, le maintien d'une telle lignée stabilisée exige la sélection, à chaque génération, de femelles présentant un minimum de décrochage.

b) Classe *re/re*. — Les mouches de ce génotype sont en général résistantes au CO_2 . Cependant on peut trouver de rares sensibles : leur fréquence est inférieure à 0,01.

CROISEMENT III.

Les femelles *re/re* filles de femelles *re/+* donnent après croisement avec un mâle *+/+* une descendance homogène *re/+*. Cette descendance est en général sensible. D'après le critère du test de la descendance ces femelles doivent être qualifiées de stabilisées et cependant elles n'accusent pas le symptôme de la sensibilité. Pour cela, elles ont été appelées « crypto-stabilisées ».

Les résultats de ce croisement montrent que les gènes viraux ont pu se maintenir dans la lignée germinale de mouches homozygotes réfractaires.

Les femelles crypto-stabilisées présentent une fréquence de décrochage un peu plus importante que celle des femelles *re/+*.

CROISEMENT IV.

Les femelles de ce croisement sont des filles de crypto-stabilisées, elles sont de génotype *re/+* et sont sensibles au CO_2 , mais généralement elles ne sont pas stabilisées, ce qui se traduit dans ce cas par leur inaptitude totale à transmettre le virus. Seulement 3 stabilisées sur 54 femelles ont été observées. Quant à ces trois femelles elles-mêmes, elles présentaient des décrochages très importants. Donc à ce niveau, la perte de l'état stabilisé est la règle habituelle.

J'ai essayé de voir si σ pouvait se maintenir à travers deux générations *re/re*. Sur 13 femelles *re/re*, filles de femelles crypto-stabilisées *re/re*, 12 ont donné des descendance entièrement résistantes ; une seule a fourni un seul individu *re/+* sensible parmi 37.

En résumé, on se trouve devant la situation suivante :

a) Le fait qu'une femelle infectée, fille de stabilisée, soit elle-même stabilisée ou non dépend du génotype de sa mère.

— Les mères $+/+$ ou $re/+$ engendrent des filles stabilisées.

— Les mères re/re engendrent presque toujours des filles non stabilisées.

b) Le fait qu'une mouche infectée manifeste ou non le symptôme caractéristique dépend en revanche de son propre génotype.

— Les mouches $+/+$ ou $re/+$ sont sensibles au CO_2 .

— Les mouches re/re sont résistantes.

Il serait maintenant intéressant d'examiner plus en détail le problème des décrochages. Iconomidis et L'Héritier [4] avaient conclu de l'étude des décrochages spontanés, c'est-à-dire de ceux qui se produisent normalement dans toute souche stabilisée banale, qu'ils appartenaient à deux types : les décrochages précoces et les décrochages tardifs.

Deux aspects du phénomène de décrochage peuvent en effet être considérés :

1° Le pourcentage de descendance qui ont été le siège d'au moins un événement entraînant la perte des génomes viraux pour une cellule de la lignée germinale.

2° Dans chaque descendance, le pourcentage d'individus s. v. grâce auquel on peut déterminer s'il s'agit d'un décrochage précoce ou tardif.

Les décrochages précoces se situent au moment de l'embryogenèse et correspondent à une perte du virus par les cellules germinales primordiales (c. g. p.) au moment de leur isolement. Ainsi il se forme des clones d'ovogonies s. v. On admet que le nombre des c. g. p. varie entre quelques unités et une dizaine. Selon que 1, 2, 3... ou toutes les c. g. p. seront atteintes par le décrochage, un pourcentage plus ou moins important de la descendance sera s. v. Il est toujours dans ce cas au moins égal à 10 p. 100.

Les décrochages tardifs se situent chez la femelle adulte et correspondent à une perte fortuite du virus par des ovogonies destinées à devenir prochainement des ovocytes. Les décrochages n'affectent qu'une faible fraction de ceux-ci et l'on considère que des pourcentages de s. v. de l'ordre de 5 sont le fait de décrochages tardifs.

En fait, décrochages tardifs et décrochages précoces ne sont pas exclusifs l'un de l'autre, mais peuvent se présenter conjointement. L'importance globale du décrochage déterminé parmi les individus $re/+$ d'une descendance permettra de connaître, pour chacun des stades considérés, la fréquence des individus infectés.

B. — RICHESSE DE L'HÔTE EN VIRUS INFECTIEUX AUX DIFFÉRENTS STADES DU DÉVELOPPEMENT ET VARIATION DE CETTE RICHESSE SELON LE GÉNOTYPE.

La richesse a été étudiée à quatre stades : cyste 10 B, larve jeune, larve vieille, imago. Pour chacun d'eux, on peut considérer, d'une part, la fréquence avec laquelle on rencontre du virus extractible et d'autre part, dans les cas positifs, la quantité de celui-ci.

1° La première donnée nous amène à comparer la fréquence des cas d'absence de virus dans le stade considéré et à estimer si celle-ci est compatible ou non avec celle des décrochages constatée chez les imagos.

En l'absence du gène *re*, les décrochages sont très rares et corrélativement tous les broyats de cystes et de larves qui ont été pratiqués ont fourni une réponse positive.

CROISEMENT DU TYPE II : ♀ *re/+* stab. × ♂ *re/re*.

Dans ce type de croisement les décrochages se produisent avec une fréquence non négligeable. Les pontes d'un certain nombre de femelles individuelles ont été recueillies, ce qui a permis, dans chaque descendance, de récolter des larves dont le contenu viral a été étudié et d'obtenir des imagos qui ont été soumises au test du CO₂. Ensuite, chacune des mères est sacrifiée pour en extraire les cystes ovariens.

La connaissance de l'importance du décrochage dans la fraction *re/+* de la descendance permet de calculer le nombre d'individus s. v. attendu pour chaque stade étudié. Ainsi sur 50 cystes étudiés, 18 s. v. sont révélés s. v. Le nombre attendu est 19 et l'écart n'est pas significatif. Donc tous les cystes qui sont destinés à fournir des mouches infectées contiennent du virus infectieux.

Les larves se répartissent en deux classes : *re/+* et *re/re*. Il est intéressant de savoir si σ se retrouve dans ces deux classes ou seulement dans la classe *re/+*. Selon l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, le nombre calculé de larves s. v. attendu sera différent.

Pour les larves jeunes, 71 ont été étudiées et 41 étaient s. v. Les nombres de s. v. calculés dans chacune des deux hypothèses sont respectivement de 25 et 48. Pour les larves vieilles nous avons observé 66 s. v. sur 92 et pareillement les nombres calculés sont respectivement 38 et 65. Ces données conduiraient donc à admettre que seules les larves *re/+* possèdent une quantité décelable de virus alors que les larves *re/re* c'est-à-dire, en fait, les individus crypto-stabilisés, n'en possèdent pas. L'étude de la distribution des quantités de virus fournies par les individus nous amènera plus loin à apporter un léger correctif à cette conclusion.

CROISEMENT DU TYPE III : ♀ *re/re* « crypto » × ♂ *+/+*.

Sur 16 cystes broyés, 15 ne contenaient aucune quantité décelable de virus infectieux et un seul une très faible quantité (3 à 4 unités infectantes). Les femelles ne présentaient cependant qu'un faible décrochage et le nombre calculé de cystes s. v. est de 1,5. Donc on peut dire qu'en général les cystes *re/re* d'une femelle crypto-stabi-

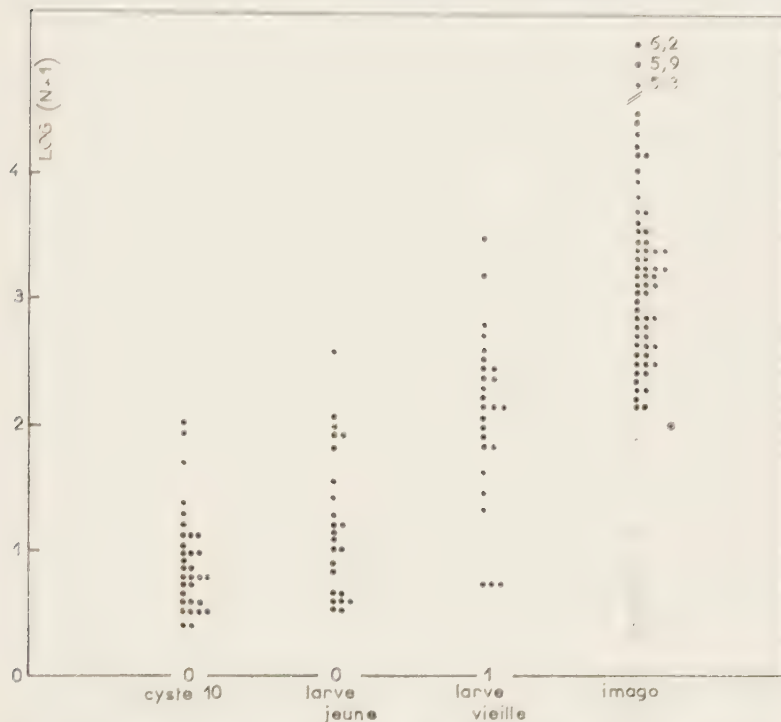


FIG. 1. — Evolution du rendement viral fourni aux différents stades par les descendants du croisement : ♀ *re/+* stab. × ♂ *re/+*. Individus *re/+* (●) ; *re/re* (○) et une imago *re/re* sensible (◉) [les chiffres figurants sur l'axe des abscisses représentent le nombre calculé d'individus infectés dont le rendement est nul].

lisée, bien que certainement infectés, sont dépourvus de virus infectieux.

Sur 18 larves jeunes, 11 sont s. v. alors que le nombre attendu est 2. Sur 20 larves vieilles, 2 sont s. v. alors que le nombre attendu est 2. Les descendants de ce croisement sont donc issus de cystes *re/re* qui généralement ne contiennent pas de virus infectieux. Ensuite, celui-ci commence à s'accumuler. Le phénomène est déjà sensible

chez les larves jeunes dont une fraction notable en contient au moment du broyat. Il devient beaucoup plus apparent dans les larves vieilles qui en contiennent toutes (aux décrochages près) en quantité appréciable.

En résumé, nous avons vu que le fait qu'une imago infectée soit sensible au CO_2 ou non, dépend de son génotype, de même le fait qu'un individu contienne ou non du virus infectieux en quantité appréciable dépend de son génotype.

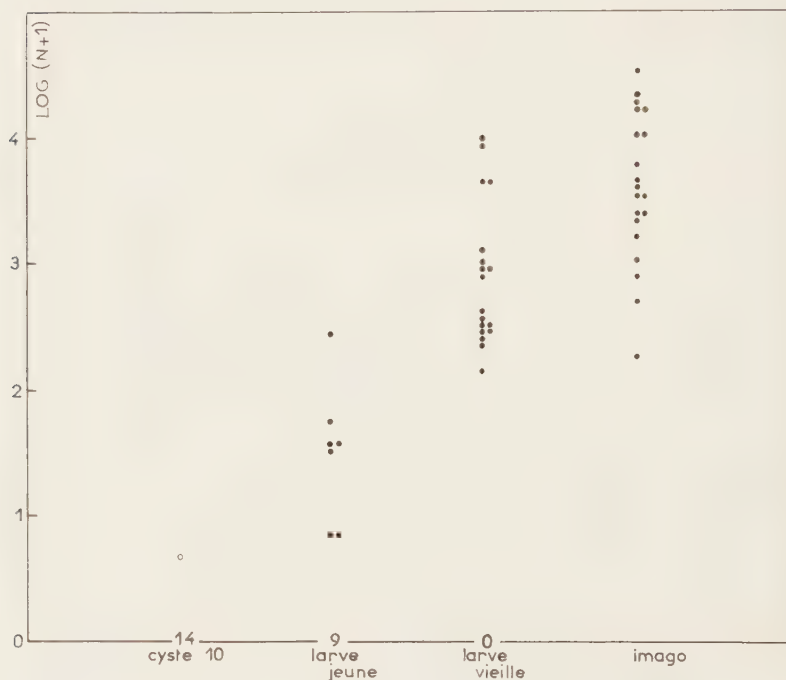


FIG. 2. — Evolution du rendement viral fourni aux différents stades par les descendants du croisement ♀ *re/re* cryptostabilisée × ♂ *+/+*. Stade *re/re*: cystes (○); stade *re/+* (●) [les chiffres figurant sur l'axe des abscisses représentent le nombre calculé d'individus infectés dont le rendement est nul].

2° Considérons maintenant la richesse en virus infectieux. Les figures 1 et 2 expriment les variations de richesse des quatre stades considérés respectivement pour les descendants du croisement II et ceux du croisement III.

Sur la figure 1, dans la colonne imago figure une des rares mouches *re/re* sensibles; sa richesse est notable bien qu'inférieure à celle de ses sœurs *re/+*.

Nous nous sommes demandés si les mouches *re/re* non sensibles au CO_2 pouvaient contenir une quantité appréciable de virus infectieux. Cette recherche pouvant être assez longue, nous avons broyé ces mouches crypto par groupes de 10, ce qui permettait d'abord d'avoir des extraits plus concentrés et ensuite d'étudier un plus grand nombre de mouches. Ces résultats sont figurés sous forme de cercles vides : sur 13 groupes étudiés, 12 ont montré un rendement non nul. L'ordonnée correspond, pour chaque lot, au rendement moyen par

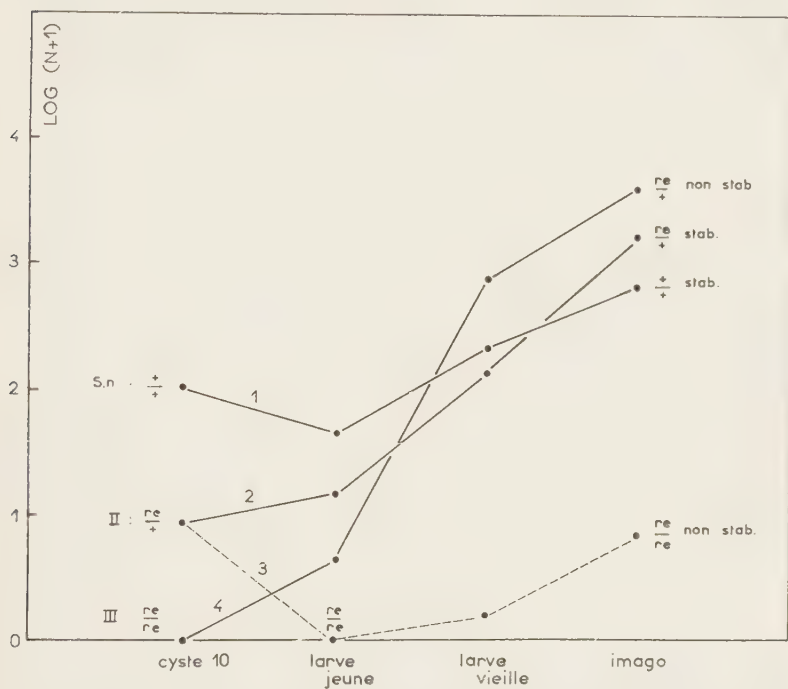


FIG. 3. — Evolution des richesses moyennes de chacun des quatre stades considérés issus d'une souche normale (s.n.) et des croisements II et III.

mouche présumée infectée. Pour le calcul de cette moyenne, nous avons en effet tenu compte de l'importance de décrochage individuel de la mère, mesurée parmi ses descendants *re/+*.

Pour chaque type de croisement et pour chaque stade de la vie de la drosophile, nous avons calculé la moyenne des valeurs individuelles pour la métrique $\log (N + 1)$. Cette moyenne sera considérée comme le rendement moyen du stade considéré.

La figure 3 résume toutes ces données et permet d'avoir une vue d'ensemble sur l'évolution de la richesse en virus infectieux.

Le graphique 1 correspond à l'évolution des richesses des différents stades chez la souche d'origine $+/+$. Il correspond très bien à l'évolution globale de la richesse telle qu'elle a été décrite par Bregliano [1]. Les points les plus caractéristiques sont la pente relativement faible durant la vie larvaire et le niveau relativement bas atteint au stade imago.

Les graphiques 2 et 3 correspondent aux deux classes $re/+$ et re/re d'un croisement II. Si l'on examine la colonne « imago » de la figure 1, on constate que trois points de valeur particulièrement élevée se détachent nettement de la population de points. De même, dans la colonne « larve vieille », il existe deux points supérieurs et trois points inférieurs qui ont moins de 5 p. 100 de chance d'appartenir à la distribution. Les points inférieurs ont été éliminés pour la raison suivante : les imagos re/re contiennent un peu de virus infectieux et il ne serait pas étonnant que ces richesses anormalement basses pour des larves vieilles correspondent à des individus re/re . Ces points ont été inclus dans le calcul de la moyenne des larves vieilles re/re . Les richesses anormalement fortes, pour les larves vieilles ont été aussi éliminées. Les larves et les imagos anormalement riches appartiennent aux mêmes familles ce qui rend probable le fait que dans ces cas nous avons affaire à un mutant affectant soit la richesse soit l'aptitude à se développer dans un hôte $re/+$.

Tous ces points extrêmes ont donc été éliminés pour le calcul des moyennes du graphique 2.

Le graphique 4 montre l'évolution de la richesse des filles de crypto qui se caractérise par une accumulation très rapide de virus infectieux et un très haut niveau atteint par les imagos.

La figure 3 offre une vue synthétique intéressante qui permet de faire plusieurs constatations.

Première constatation : A l'état hétérozygote, le gène re n'empêche apparemment pas l'accumulation de virions chez les imagos et semble donc se comporter comme un gène récessif. Ceci est en accord avec le fait constaté par ailleurs que l'inoculation d'un virus P^- détermine chez des hôtes $re/+$ une richesse aussi grande sinon plus que chez des hôtes $+/+$. Cependant, cette accumulation pourrait se faire beaucoup plus lentement dans les ovocytes $re/+$, qui sans doute pour cette raison sont relativement pauvres.

Deuxième constatation : L'appartenance d'une mouche à l'un ou à l'autre des deux états possibles stabilisé ou non stabilisé, est en relation directe avec la richesse en virions de l'ovocyte dont cette mouche est issue. Ceci rejoint directement les faits trouvés par Bregliano [2] : les ovocytes qui vont donner des mouches stabilisées sont plus riches que les ovocytes qui vont donner des mouches non stabilisées.

Troisième constatation : En revanche, la relation entre l'alternative : état stabilisé ou non stabilisé et la richesse en virions de l'imago est en sens inverse. Ceci est en accord avec le fait bien connu que les non stabilisées sont plus riches que les stabilisés. Les mouches *re/+* du graphique 2 seraient non seulement des mosaïques germinales mais aussi des mosaïques somatiques de tissus stabilisés pauvres et de tissus non stabilisés riches, d'où leur richesse intermédiaire.

Quatrième constatation : Les mouches *re/re* ne sont pas sensibles ; elles contiennent cependant une faible quantité de virions. La présence du gène *re* à l'état homozygote empêche que la mouche soit envahie par σ jusqu'au niveau nécessaire à l'apparition du symptôme.

C. — POSSIBILITÉ DE SURINFECTION AUX DIFFÉRENTS STADES

LES MÉTHODES UTILISÉES POUR RÉALISER LA SURINFECTION.

Il y a deux manières différentes pour tenter d'introduire un virus surinfectant dans une mouche. Dans la première manière, l'opération est réalisée au niveau de la mouche adulte infectée. Celle-ci est inoculée avec un extrait infectieux. Ce qui est mis à l'épreuve dans ce cas est l'immunité du soma. Dans la deuxième manière, c'est à l'occasion de la fécondation qu'est réalisée l'opération. Une femelle porte, à l'état stabilisé, une souche virale dite « maternelle » et le mâle porte, à l'état stabilisé, une souche virale dite « paternelle ». Ce qui est mis à l'épreuve ici est l'immunité du germe.

La vérification du succès de l'opération suppose évidemment des marqueurs génétiques distincts pour le virus *in situ* et pour le virus surinfectant.

RÉSULTATS OBTENUS EN L'ABSENCE DU GÈNE *re*.

La surinfection par inoculation des mouches infectées banales, dans lesquelles le cycle de multiplication virale s'est accompli, s'est jusqu'à présent révélée inopérante (de Lestrangé [6]). Le seul exemple de surinfection effective concerne des mouches stabilisées pour un virus défectif « ultra- ρ » (Brun [3]). De telles mouches ne sont normalement pas sensibles au CO_2 et ne contiennent pas de virus infectieux extractible. A la suite d'une inoculation, un virus surinfectant se multiplie dans ces mouches et entraîne l'apparition du symptôme de la sensibilité. Si, comme l'a fait Brun, nous convenons d'appeler immunité le fait qu'un hôte exerce un barrage à la multiplication d'un virus surinfectant, on peut dire que les stabilisées banales présentent une immunité absolue alors que les mouches « ultra- ρ » n'ont qu'une immunité relative permettant une multiplication du surinfectant. Cette dernière est cependant beaucoup plus lente que chez des hôtes sans virus. L'immunité des mou-

ches « ultra- ρ » a été longuement étudiée. Divers facteurs peuvent la faire varier et en particulier le gène réfractaire qui l'abaisse sensiblement.

Nous avons tenté la surinfection de l'ovule au cours de croisements du type suivant : ♀ $+/+$ σ maternel $\times$ ♂ $+/+$ σ paternel : toutes ces mouches étaient stabilisées et tous les virus paternels étaient évidemment v^+ , donc étaient transmis par les spermatozoïdes.

Le tableau II donne les caractères des virus utilisés dans les trois types de croisements. Ces expériences ne seront pas décrites en détail. Il est seulement utile de savoir que, malgré l'examen d'un

TABLEAU II. — Essais de surinfection d'ovules $+/+$.

N° DE L'EXPÉRIENCE	σ MATERNEL	σ PATERNEL	CARACTÈRE RECHERCHÉ DANS LA DESCENDANCE
III IV, V	g^- ultra- ρ	g^+ σ banal	passage au germe sensibilité au CO_2 présence de σ infectieux
VI, VII, IX	v^-	v^+	valence des mâles

très grand nombre de descendants, les marqueurs du virus paternel n'ont jamais pu être mis en évidence. Dans l'expérience IX, malgré 8 *back-cross* successifs, tous les mâles étudiés étaient parfaitement v^- .

Cet échec dans la tentative de retrouver le virus paternel dans ce type de croisement, démontre l'immunité absolue qui est celle de tout ovule appartenant à une ligne stabilisée et dont le génotype est $+/+$.

Il est alors apparu intéressant d'essayer de donner un avantage sélectif au virus paternel. Le moyen consiste à utiliser un virus maternel P^- et un virus paternel P^+v^+ en présence du gène *re*. Dans l'expérience réalisée, le gène *re* était apporté par le spermatozoïde dans un croisement du type : ♀ $+/+$ $P^- \times$ ♂ $re/+$ P^+v^+ .

Dans ce cas non plus, le marqueur paternel n'a jamais pu être retrouvé. Sans doute parce que le gène *re* est introduit trop tardivement pour pouvoir favoriser le « σ paternel ».

RÉSULTATS OBTENUS EN PRÉSENCE DU GÈNE *re*.

Ces essais de surinfection s'étant montré inefficaces, nous avons pensé que le système des cryptostabilisées se prêterait beaucoup mieux à ce genre d'expériences.

a) *Absence d'immunité somatique des cryptostabilisées.* — Des imagos cryptostabilisées *re/re* ont été inoculées avec diverses souches virales P^+ . Le tableau III montre que, quelle que soit la souche virale P^+ utilisée, il n'y a pas de différence notable entre les temps d'incubation des mouches cryptostabilisées *re/re* et des témoins de même génotype. Si l'on se borne au temps nécessaire pour le déve-

TABEAU III. — Expériences de surinfection d'imagos par inoculation

SOUCHE p^+ UTILISÉE	TEMPS D'INCUBATION OBTENUS DANS DES MOUCHES	
	Cryptostabilisées	Témoins <i>re/re</i>
<i>Bel</i>	1 ^{er} lot 13 jours	14,5 jours
	2 ^e lot 14,7 jours	
49	7,5 jours	8,8 jours
	8,2 jours	8,2 jours
	10,7 jours	10,5 jours

loppement du symptôme, on peut donc conclure à l'absence d'immunité. Notons toutefois qu'aucune mesure n'a été faite pour tenter de savoir si ces mouches surinfectées contiennent la même quantité de virus infectieux que les mouches témoins.

b) *Action du gène *re* sur l'immunité de l'ovule.* — Nous avons maintenant utilisé des femelles stabilisées de génotype *re/+* ou *re/re* pour voir si cette fois il était possible d'introduire avec succès le virus paternel dans un ovule.

Le tableau IV montre les résultats obtenus au cours du croisement suivant : ♀ *re/+* P^- × ♂ *re/+* P^+v^- .

Tous les ovules ont le même génotype et tous sont stabilisés (aux décrochages près). Les descendants se répartissent en deux classes dont les génotypes sont d'une part *re/+* ou *+/+* et d'autres part *re/re*.

On voit que dans ce cas une fraction notable des descendants *re/re* est sensible au CO_2 . Rappelons que lorsque le mâle est s.v., les mouches de cette même origine et de ce même génotype sont au contraire toujours résistantes. Donc parmi les mouches *re/re*, celles qui sont sensibles, le deviennent grâce au virus paternel P^+ et leur pourcentage exprime la valence du mâle éventuellement réduite d'un facteur dû à l'immunité.

Quant aux descendants *re/+* ou *+/+*, la grande majorité est sensible au CO_2 . Ce résultat est évidemment attendu, puisque une mouche de cette catégorie ne peut être résistante que d'une part si son ovule appartient à un clone décroché et d'autre part si elle n'a pas reçu σP^+ .

Chaque mâle individuel a de plus été croisé avec une femelle $re/+$ s.v. afin de déterminer sa valence chez ses descendants soit $re/+$ ou $+/+$, soit re/re ; c'est cette dernière qui est indiquée « valence témoin » dans le tableau IV.

Dans une expérience de ce type, on peut faire deux hypothèses extrêmes consistant à admettre soit une immunité absolue, soit une absence totale d'immunité. Cette dernière hypothèse paraît

TABLEAU IV. — Expérience de surinfection d'ovules $re/+$.

N ^o CROIS ^t	% SENSIBLE OBSERVÉ			% ATTENDU SI IMMUNITÉ ABSOLUE	VALENCE = DISTRIBUTION DE POISSON facteur de réduction dû à l'immunité
	valence témoins	Expérience			
		desc. re/+ ou +/+	desc. re/re		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	17	98,5	5,5	0,34	3,2
2	16	97,2	9	1,2	1,8
3	26	99,1	5,1	0,76	5,9
4	34	97,9	12	1,4	3,2
5	42	99,4	7,4	0,43	7,3
6	35	97	12	1,6	3,5
7	46	100	7	0	8,8
8	20	100	0	0	∞
9	24	100	5	0	5,4
10	45	97,8	11	1,8	5,4
11	45	98,4	7	1,4	8,6
15	30	99	3	0,43	14

a priori assez improbable puisque les ovules, au moment de leur fécondation, sont en général stabilisés et possèdent une notable quantité de virions. Cependant, elle serait vérifiée si les valeurs notées dans les colonnes 2 et 4 étaient sensiblement les mêmes, ce qui n'est pas le cas.

Si au contraire, il y avait une immunité absolue, les seuls descendants re/re sensibles seraient issus d'ovocytes décrochés donc s.v. qui auraient alors pu être infectés par σP^+v^+ . J'ai estimé le pourcentage de sensibles attendu dans le cas d'une immunité absolue. Cette estimation, qui figure dans la colonne 5, a été obtenue par le calcul suivant :

La fraction résistante des catégories non homozygotes re/re de chaque descendance doit être égale à la fréquence de décrochage multipliée par $(1-v)$, v étant la valence du mâle calculée sur les

mêmes catégories génétiques fournies par la femelle s.v. Cette même fréquence de décrochage ainsi calculée est alors multipliée par la valence dite témoin (colonne 2) qui est celle calculée sur la fraction re/re de la descendance de la femelle s.v. Les valeurs obtenues sont évidemment très inférieures aux valeurs réelles observées. Il faut donc admettre que l'immunité constatée n'est, dans ce cas, que relative. Mais comment l'exprimer? C'est assez difficile en l'absence d'une explication complète et cohérente du phénomène de la valence. Cependant, on peut essayer de préciser la pensée de la façon suivante: on peut admettre que la distribution des valences correspond à une distribution de Poisson. Par exemple, une valence de 63 p. 100 signifierait qu'il y a en moyenne un génôme viral efficace par spermatozoïde. Sans doute est-ce un peu arbitraire et faut-il ne pas insister outre mesure; mais cela nous permet de chiffrer la réduction due à l'immunité pour chaque croisement. Sauf pour un cas, on voit que ce facteur de réduction varie de 2 à 14 avec une moyenne voisine de 5.

Un certain nombre de femelles cryptostabilisées re/re rendues sensibles par la présence de σP^+ ont été croisées avec des mâles $re/+$ s.v. Les descendes de la classe $re/+$ se sont généralement révélées sensibles au CO_2 dans des proportions notables alors que les descendes de la classe re/re se sont montrées parfaitement résistantes. Ces femelles étaient donc doublement infectées: elles avaient d'une part un soma infecté par le virus paternel P^+ , d'autre part, le germe portait l'information du virus maternel P^- . Leurs descendes étaient complètement débarrassées du virus paternel

TABLEAU V. — Expérience de surinfection d'ovules re/re .

N° CROIS ^t	EXPÉRIENCE : % SENSIBLES		VALENCE TÉMOIN % sensibles
	descendance $re/+$	descendance re/re	
21	95	0	0
22	94	61	58
23	87	75	76
24	99	55	70
25	100	50	48
26	85	55	66
27	99	48	43
28	63	63	86
29	99	44	34
30	79	55	48
31	82	42	33
32	87	62	31
34	98	49	30

P^+ . En effet, en présence de re , le passage au germen qui aurait pu en principe avoir lieu ici (le virus paternel est g^+ et les ovules ne sont pas immuns) est énormément déprimé et se trouve le plus souvent inexistant. C'est un exemple frappant de l'indépendance presque totale qui existe, dans le cas des relations virus-drosophile, entre le soma et le germen de l'hôte.

Le tableau V montre les résultats obtenus à la suite du croisement $\varnothing re/re P^+ \times \sigma re^- \cdot P^+ v^+$.

Ici, la femelle est une cryptostabilisée. Tous les gamètes ont le même génotype et tous les ovules sont stabilisés (aux décrochages près).

Les descendants de génotype re/re sensibles au CO_2 , le deviennent grâce au virus paternel P^+ . Il est clair, sans faire de calculs statistiques que la valence calculée sur les descendants re/re de femelles témoins ou sur les descendants re/re de femelles cryptostabilisées est sensiblement du même ordre. Les croisements correspondant aux n° en caractères italiques du tableau V sont particulièrement probants. En effet, les femelles de ces croisements présentent des décrochages faibles donc, lorsqu'ils ont été infectés, la plupart des ovules étaient stabilisés et portaient des génômes viraux maternels. Ceux-ci ne semblent pas avoir conféré la moindre immunité aux ovules qui les portaient.

CONCLUSION

Deux points importants peuvent être dégagés de ce travail.

Le premier concerne le maintien de l'état stabilisé. D'après les résultats de Bregliano et les nôtres, il semble bien qu'il y ait une correspondance stricte entre la richesse de l'ovocyte en virus infectieux et l'état stabilisé ou non stabilisé de l'adulte qui en est issu. Cette correspondance s'observe aussi bien dans le cas de l'auto-entretien de l'état stabilisé par l'hérédité maternelle que dans celui où cet état s'installe à nouveau à la suite d'un « passage au germen ». Le choix entre les deux états, stabilisé ou non stabilisé, se situe très probablement au moment de l'isolement des cellules germinales promordiales (c.g.p.), c'est-à-dire entre le cyste au stade 10B et la larve jeune que nous avons étudiés. La comparaison des graphiques de la figure 3, nous amène à conclure à une corrélation positive très probable entre la richesse de l'ovocyte et celle de l'individu lors de l'isolement des c.g.p. Selon la richesse de l'individu à ce moment (et en l'occurrence cette richesse dépend de l'ovocyte d'où l'individu est issu), toutes les c.g.p. seront infectées ou seulement quelques-unes ou même aucune.

Pour l'instant, il est impossible de savoir quel rôle jouent réellement les virions observés au niveau de l'ovocyte dans le maintien

de l'état stabilisé. Ils sont seuls directement détectables. Mais peut-être ne jouent-ils pas le rôle principal et ne sont-ils que les témoins soit de l'abondance plus ou moins grande, dans le cytoplasme, de génômes viraux n'ayant pas participé à un processus de maturation, soit d'un état cellulaire particulier ?

Le deuxième point intéressant est celui des individus cryptostabilisés. On peut, à leur sujet, se poser deux questions. Quelle est l'origine du virus infectieux que l'on retrouve en petites quantités chez certaines imagos ? Les cellules somatiques de l'imago sont-elles infectées ? Nous avançons trois hypothèses.

1° Toutes les cellules somatiques des imagos cryptostabilisées sont dépourvues de virus. L'absence totale « d'immunité » somatique serait ainsi parfaitement expliquée. Mais cette hypothèse implique qu'un stock de virions soit constitué avant que l'individu ne devienne complètement *re/re*, c'est-à-dire avant l'embryogenèse. Ceci nous semble assez peu vraisemblable. En effet, l'embryogenèse et la nymphose sont des phases critiques au cours desquelles on observe régulièrement une baisse sensible de la richesse en virus infectieux. De plus, on voit mal comment des virions pourraient subsister ainsi, dans un hôte dépourvu d'immunité, sans être adsorbés.

2° Toutes les cellules somatiques contiennent des génômes viraux et les maturations sont rares ou peu abondantes. C'est le cas qui se rapprocherait le plus du type ultra-*p*. Les mouches cryptostabilisées en diffèrent cependant notablement par la facilité avec laquelle on peut les surinfecter avec un virus génétiquement adapté. Cette hypothèse extrême ne nous paraît pas non plus très vraisemblable. Puisque le gène *re* induit à l'état hétérozygote donc *a fortiori* à l'état homozygote des mosaïques somatiques.

3° Quelques cellules somatiques seulement ont hérité de génômes viraux et fournissent une récolte normale. Cette dernière hypothèse nous paraît plus vraisemblable. En effet, nous montrerons par ailleurs que l'inoculation d'imagos *re/re* s.v. avec un virus *P* est suivie d'une absorption normale mais que généralement aucune multiplication virale ne peut être mise en évidence. Cependant dans quelques cas, il résulte du succès fortuit de quelque événement que nous pensons précoce, une multiplication virale. Mais l'infection reste apparemment limitée et la récolte virale est faible. On peut penser que chez les imagos cryptostabilisées, avec la présence de génômes viraux dans un certain nombre de cellules somatiques, cet événement précoce se trouve réalisé *ipso facto*. Et selon le nombre de cellules impliquées, ces imagos produiraient un nombre plus ou moins grand de virions. Mais en tout cas l'infection ne s'étendrait pas et la majeure partie du soma resterait sans virus et ne présenterait aucune « immunité ».

SUMMARY

The *re* gene of *Drosophila*, when heterozygous, slows down, and when homozygous, entirely prevents the multiplication of an inoculated *P*⁻ sigma virus. The effects of the *re* gene have been studied with respect to :

- the hereditary transmission of the stabilized condition,
- the appearance of the CO₂ sensitivity symptom,
- the infectious yield exhibited by the host at various developmental stages,
- the degree of the host immunity against a superinfectant virus.

Every *re*/+ infected fly is sensitive to CO₂, whereas, every *re/re* infected fly is resistant. The infectious yield of an oocyte is determined by the heterozygosity or homozygosity of the *re* gene. In the first case, the yield and the degree of immunity are low. In the second, both are zero. The level of the infectious yield of the oocyte seems responsible for the stabilized or non stabilized character exhibited by the imago later on. The possibility of transmitting the stabilized condition by a female depends upon the genotype of the mother. An infected *re*/+ female usually gives rise to partially stabilized daughters. The *re*/+ offspring of an infected *re/re* female, resistant to CO₂, is sensitive but non stabilized. Thus the σ virus is able to pass through a generation of *re/re* females in a cryptic condition.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BREGLIANO (J.-C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **256**, 2942.
- [2] BREGLIANO (J.-C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109**, 638.
- [3] BRUN (G.). Thèse Biologie expérimentale, Orsay, 1963.
- [4] ICONOMIDIS (J.) et L'HÉRITIER (Ph.). *Ann. Génét.*, 1961, **2**, 53.
- [5] KING, RUBINSON and SMITH. *Growth*, 1956, **20**, 121.
- [6] LESTRANGE (M.-Th. DE). *Ann. Génét.*, 1963, **6**, 39.
- [7] L'HÉRITIER (Ph.) et TEISSIER (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **205**, 1099.
- [8] OHANESSIAN-GUILLEMAIN (A.). *Ann. Génét.*, 1963, **5**, 1.
- [9] PLUS (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 347.

